昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, July 2014, 57(7): 769 – 776　　ISSN 0454-6296

氧化损伤是热胁迫下小金蝠蛾幼虫不能存活的重要原因

王梦龙[1,2], 朱　未[2], 张继红[2], 徐安英[1], 王红托[2]
李　瑄[2], 周桂灵[2], 张　寰[2], 秦启联[2,*]

(1. 江苏科技大学蚕业研究所, 江苏镇江 212018; 2. 中国科学院动物研究所, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100101)

摘要:【目的】小金蝠蛾 *Thitarodes xiaojinensis* 是冬虫夏草菌 *Ophiocordyceps sinensis* 的寄主昆虫,生活于高海拔、高寒地区,低温适应性强,但在室温下(25～27℃)不能正常存活。本研究检测了热胁迫(27℃)对小金蝠蛾幼虫消化酶及抗氧化系统的影响,以期揭示小金蝠蛾室温不耐受的生理机制。【方法】小金蝠蛾 8 龄幼虫分两组进行处理:高温组于 27℃下饲养,对照组于 16℃下饲养。处理 24 h 后观察虫体状态,并解剖,取中肠及血淋巴。透射电镜观察中肠细胞线粒体结构,分别测定中肠总蛋白酶和糖基水解酶活性,血淋巴丙二醛(MDA)含量,以及血淋巴保护酶系中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)的活性。【结果】两组幼虫中肠总蛋白酶及糖基水解酶活性均随反应温度(16～37℃)升高而增强。协方差分析显示,高温组幼虫酶活性极显著低于对照组($P < 0.01$)。然而,高温组幼虫在 27℃下的酶活性与对照组幼虫在 16℃下的酶活性无显著差异($P < 0.05$)。热胁迫下虫体血淋巴中丙二醛含量显著升高($P < 0.05$),提示出现了氧化损伤。透射电镜结果显示,高温组中肠细胞线粒体肿胀,膜受损,嵴排列混乱,结构破坏。对活性氧起清除作用的 3 种保护酶中,仅 POD 活性显著升高($P < 0.05$),SOD 和 CAT 活性均无显著变化($P > 0.05$)。【结论】消化酶活性的变化可能不是小金蝠蛾室温不耐受的重要因素;氧化损伤是其热胁迫下不能正常存活的一个重要原因。

关键词: 小金蝠蛾; 热胁迫; 保护酶; 消化酶; 氧化损伤; 线粒体结构; 酶活性
中图分类号: Q965　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0454-6296(2014)07-0769-08

Oxidative damage is one of the most important causes of death of *Thitarodes xiaojinensis* (Lepidoptera: Hepialidae) larvae under heat stress

WANG Meng-Long[1,2], ZHU Wei[2], ZHANG Ji-Hong[2], XU An-Ying[1], WANG Hong-Tuo[2], LI Xuan[2], ZHOU Gui-Ling[2], ZHANG Huan[2], QIN Qi-Lian[2,*] (1. The Sericultural Research Institute, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang, Jiangsu 212018, China; 2. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: 【Aim】The ghost moth, *Thitarodes xiaojinensis* (Lepidoptera: Hepialidae), is a host insect of Chinese caterpillar fungus (*Ophiocordyceps sinensis*). Living at high altitude area, *T. xiaojinensis* is well adapted to the cold environment, while fails to survive under room temperature (RT, 25 – 27℃). To elucidate the physiological mechanism of death under RT, the effects of heat stress (27℃) on the digestive enzymes and antioxidant system of larval *T. xiaojinensis* were investigated. 【Methods】The 8th instar larvae of *T. xiaojinensis* were treated in two groups: the high temperature group maintained at 27℃ and the control group maintained at 16℃. At 24 h after treatment, the living state of larvae was observed, and midguts and hemolymph were obtained through dissection. The relative contents of malondialdehyde (MDA) in the hemolymph were measured. The mitochondria structures of the midgut cells were observed under transmission electron microscope (TEM). The activities of enzymes including the total proteases and glycosyl hydrolase in the midgut, superoxide dismutase enzyme (SOD), catalase (CAT), and peroxidase (POD) in the hemolymph were tested. 【Results】The activities of the total

基金项目: 国家自然科学基金项目(31272366); 中国科学院重要创新方向项目(KSCX2-YW-G-076)
作者简介: 王梦龙, 男, 1988 年生, 山东威海人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫生理生态, E-mail: wml881108@gmail.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: qinql@ioz.ac.cn
收稿日期 Received: 2014-02-20; 接受日期 Accepted: 2014-06-17

protease and glycosyl hydrolase in both groups increased with the reaction temperature (16 – 37℃). Covariance analysis indicated that the enzyme activities of the high temperature group were significantly lower than that of the control group ($P < 0.01$). However, both protease and glycosyl hydrolase activities in the heat treated larvae tested at 27℃ reaction temperature were not significantly different from that in the control larvae tested at 16℃ reaction temperature ($P < 0.05$). The MDA content in the hemolymph increased significantly after heat stress, indicating that oxidative damage occurred. The TEM analysis of mitochondria showed that mitochondrial structure was damaged with cristae disarranged and mitochondrial membrane broken. Among the protective enzymes, only the POD activity increased significantly upon heat stress ($P < 0.05$), while the SOD and CAT activities did not significantly change ($P > 0.05$). 【Conclusion】The change of digestive enzyme activities may not be the important factor for the intolerance of *T. xiaojinensis* larvae under RT. Oxidative damage is one of the most important causes of larval death of the moth under heat stress.

Key words: *Thitarodes xiaojinensis*; heat stress; protective enzymes; digestive enzymes; oxidative damage; mitochondrial structure; enzyme activity

小金蝠蛾 *Thitarodes xiaojinensis* 隶属于鳞翅目蝙蝠蛾科(Hepialidae)钩蝠蛾属 *Thitarodes*,其幼虫是我国名贵中药材冬虫夏草菌 *Ophiocordyceps sinensis* (Berk.) Sung, Sung, Hywel-Jones and Spatafora 的寄主昆虫(涂永勤等,2011),主要分布于我国四川省小金县及小金县与金钏县交界的空卡山海拔 3 000 ~ 4 800 m 的高寒地区(涂永勤等,2013),因而具有很强的低温适应性。小金蝠蛾最适生长温度为 16℃,在 0℃ 仍能正常取食活动。与此相对应的是,小金蝠蛾生长缓慢、发育历期长。自然环境下,小金蝠蛾完成一个世代一般需要 4 年(涂永勤等,2011),在室内进行人工饲养繁殖,也需要 1 年左右的时间。提高小金蝠蛾的生长速度,缩短其发育历期,对于小金蝠蛾资源的保护利用,以及冬虫夏草的人工培植意义重大。然而,小金蝠蛾对高温不耐受,在室温下(25 ~ 27℃)不能正常存活。研究小金蝠蛾的室温不耐受及其生理机制,不仅对其人工饲养具有实际指导意义,同时也丰富了小金蝠蛾幼虫生理生化方面数据,填补了冬虫夏草寄主昆虫高温胁迫相关研究的空白,为冬虫夏草寄主昆虫的热驯化研究提供一定的参考。

消化酶与底物作用,将食物分解成能被机体吸收利用的小分子物质,进而为机体提供营养及能量,是一类功能类似的酶的总称,主要包括蛋白水解酶、糖苷酶等,其活性的变化直接影响生物体的生命活动。消化酶的酶活性一般随着温度的升高而升高,达到一定峰值后,则随温度升高而急剧下降(Pavasovic *et al.*, 2004)。家蚕体内蛋白酶也具有相似规律(屠洁和王国基,2005),而对黄尾鰤的研究表明,后肠蛋白酶活性在低温时显著升高(Miegel *et al.*, 2010)。小金蝠蛾的消化酶已适应于低温环境,在热胁迫下能否正常地发挥作用,为虫体提供充足的能量来源,对于小金蝠蛾的高温生存具有重要意义。

具有很强氧化活性的超氧阴离子自由基(O_2^-)、氢氧自由基(HO·)和过氧化氢(H_2O_2)等活性氧(ROS),是生物体生命过程中产生的具有多种功能的物质。生物体在正常代谢过程中会有 0.2% 的氧形成活性氧(St-Pierre *et al.*, 2002),它参与调节细胞周期(Boonstra and Post, 2004)及细胞凋亡过程(Kasahara *et al.*, 1997),但同时对生物大分子,如蛋白质、糖类和核酸等有损伤作用。正常情况下,细胞内自由基水平很低,不会对细胞造成伤害,因为细胞内存在着自由基清除系统,即保护酶系统,用于清除生物体内的活性氧,保护结构免遭损伤,行使正常功能。这套保护酶系统包括超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD),过氧化物酶(peroxidase, POD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)(Fridovich, 1977)。SOD 可将 O_2^- 催化歧化为 O_2 和 H_2O_2,H_2O_2 能与 O_2^- 形成毒性更强的 HO·(McCord and Fridovich, 1969)。但由于细胞内还有 CAT 和 POD,这两种酶可将 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2(Felton and Summers, 1995)。在 SOD,CAT 及 POD 3 种酶协调一致下,细胞内自由基的产生与清除处于一种动态平衡状态,使自由基维持在一个低水平,保护细胞不受 ROS 的损伤。生物体在逆境条件下会增加 ROS 的产生(李周直等,1994)。崔亚东等(2010)等报道,二化螟 5 龄幼虫暴露于 33℃,36℃ 和 39℃ 3 种不同温度下,其体内的 ROS 与对照(28℃)相比显著提高。植物在逆境胁迫下也会导致大量 ROS 产

生(Gill and Tuteja, 2010)。保护酶能否有效应对骤增的活性氧,使生物体免遭氧化损伤,对逆境下生物体的生存意义重大。

为从小金蝠蛾幼虫消化酶及抗氧化系统两个角度,阐释小金蝠蛾高温不耐受的生理机制,本研究将小金蝠蛾8龄幼虫分两组进行处理:高温组于27℃下饲养,对照组于16℃下饲养,24 h后分别对消化酶活性及抗氧化系统进行测定。中肠总蛋白酶活性采用茚三酮法进行测定,糖基水解酶活性采用DNS显色法进行测定;以TBA法测定血淋巴中氧化损伤标志物——丙二醛含量,利用透射电子显微镜观察中肠细胞线粒体形态结构,以确定其是否受到氧化损伤,并分别测定血淋巴中3种保护酶的活性,即采用核黄素法测定总超氧化物歧化酶活性,钼酸铵法测定过氧化氢酶活性,以及邻苯三酚法测定过氧化物酶活性。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

小金蝠蛾 *Thitarodes xiaojinensis* 蛹采自四川省小金县,在室内羽化、交配、产卵,孵化的幼虫在实验室内16℃全黑暗条件下用胡萝卜饲养。

1.2　不同温度处理小金蝠蛾幼虫

取大小相近的小金蝠蛾8龄幼虫24头,随机分成高温组(27℃)和对照组(16℃)。每组12头幼虫,分别置于最适生长温度16℃和热胁迫温度27℃下处理24 h,观察不同处理的小金蝠蛾幼虫的活动情况,以及虫体特征和对外界刺激的反应程度,以每头幼虫为一个重复,分别进行以下生理指标或活性的测定。

1.3　消化酶活性测定

在蜡盘上解剖虫体,取出整个中肠。将中肠在1.5 mL EP管中剪碎,每管1头,4℃下4 000 g离心,取上清,为消化酶粗提液。总蛋白酶活性测定采用茚三酮比色法(蔡红和沈仁芳,2005),反应体系如下:50 μL 消化酶粗提液加150 μL 茚三酮-抗坏血酸溶液(2 g 茚三酮,0.02 g 抗坏血酸用pH 5.8的乙酸-乙酸钠缓冲液定容至100 mL),分别在16℃,27℃和37℃下反应40 min,经沸水浴15 min,冷却后加100 μL 0.2%的 KIO_3 溶液,分光光度计读取570 nm的吸光值。总蛋白酶活性定义为反应时间内 OD_{570} 变化1为一个蛋白酶活性单位(U)。糖基水解酶测定采用DNS显色法(黎军胜等,2004),反应体系如下:50 μL 消化酶粗提液加100 μL 0.5%淀粉溶液,分别在16℃,27℃和37℃下反应40 min,加100 μL 显色液(5 g 3,5-二硝基水杨酸,5 g 氢氧化钠,1 g 苯酚,0.25 g 无水亚硫酸钠,定容至500 mL),90℃加热5 min,冰浴冷却后加4%的四水合酒石酸钾钠30 μL,读取550 nm的吸光值。糖基水解酶活性定义为反应时间内 OD_{550} 变化1为一个糖基水解酶活性单位(U)。

1.4　血淋巴丙二醛(MDA)含量测定

丙二醛是机体内的活性氧作用于脂质所产生的过氧化产物。生理学上,丙二醛常作为过氧化的标志物,用来反映机体内氧化损伤的程度。由于脂质是生物膜的构成组分,因此丙二醛也成为膜损伤的标志性物质,其含量水平反映了膜脂损伤的程度。丙二醛的测定参考 Janero(1990)和 Esterbauer 和 Cheeseman(1990),并进行改进。具体如下:冰上剪开虫体的第3或第4对腹足,取10 μL 血淋巴加入200 μL 0.6% TBA 溶液(先用1 mol/L NaOH 溶解,再用10% TCA 溶液定容)沸水浴15 min,迅速冷却后,4℃ 4 000 g 离心,取上清在535 nm下测 OD 值,以 OD_{535} 值表示 MDA 在两组间的相对含量。

1.5　中肠细胞线粒体透射电镜(TEM)观察

取不同温度处理小金蝠蛾幼虫的中肠组织,用戊二醛固定,包埋、超薄切片由中国农业大学生命科学中心完成。电镜型号 JEM-1230,加速电压80 kV,观察线粒体形态结构。

1.6　保护酶活性测定

冰上用剪刀从虫体第3或第4对腹足剪开,取血淋巴。

对 SOD,CAT 和 POD 3种保护酶进行酶量梯度实验,验证实验体系的线性关系及可靠性。蛋白含量的测定采用试剂盒(购自碧云天),参照其说明书测定。

SOD 活性测定参照 Misra 和 Fridovich(1972),并略改进。反应体系为pH 7.8的0.02 mol/L PBS 缓冲液200 μL,195 mmol/L 甲硫氨酸20 μL,1.125 mmol/L NBT 40 μL,0.3 mmol/L EDTA-Na_2 10 μL,60 μmol/L 核黄素溶液10 μL,血淋巴5 μL,光照15 min后560 nm下测 OD 值。SOD 酶活性定义为反应时间内 OD_{560} 变化1为一个过氧化物酶活性单位(U)。

CAT 活性测定参照程鲁京和孟泽(1994),缩小反应体系,405 nm下测吸光度。反应体系如下:

0.9% H_2O_2(用0.02 mol/L,pH 7.4 的 PBS 稀释)30 μL,血淋巴 2 μL,室温反应 1 min,加 32.4 mmol/L 的钼酸铵 200 μL,12 000 g 离心 5 min,取 200 μL 上清测 405 nm 的 OD 值。CAT 活性定义为反应时间内 OD_{405}变化 1 为一个过氧化氢酶活性单位(U)。

POD 活性测定参照 Chance 等(1979),略有改进。反应体系为 pH 7.4 的 0.02 mol/L PBS 缓冲液 140 μL,9.5% H_2O_2 10 μL,0.5% 邻苯三酚 40 μL(pH 6.5 PBS 配制),血淋巴 4 μL,37℃ 反应 5 min,470 nm 下测定 OD 值。POD 活性定义为反应时间内 OD_{470} 变化 1 为一个过氧化物酶活性单位(U)。

1.7 数据统计与分析

使用 IBM SPSS Statistics 21 软件进行统计分析。消化酶活性的统计分析采用协方差分析,以独立样本 *t* 检验分别检验热胁迫组 27℃ 与正常组 16℃ 下的消化酶活性、丙二醛相对含量及保护酶活性的差异。用 GraphPad Prism 5.0 软件绘图。

2 结果

2.1 不同温度处理下的小金蝠蛾幼虫体征

高温组(27℃)下小金蝠蛾幼虫与对照组(16℃)相比,虫体色泽灰暗无光泽,外形干瘪,行动迟缓,对外界刺激反应迟钝;而对照组虫体色泽鲜亮,虫体饱满,且活跃好动,对外界刺激敏感(图 1)。高温组在处理 24 h 后即陆续出现濒死个体,一般于 2 ~ 3 日内全部死亡。

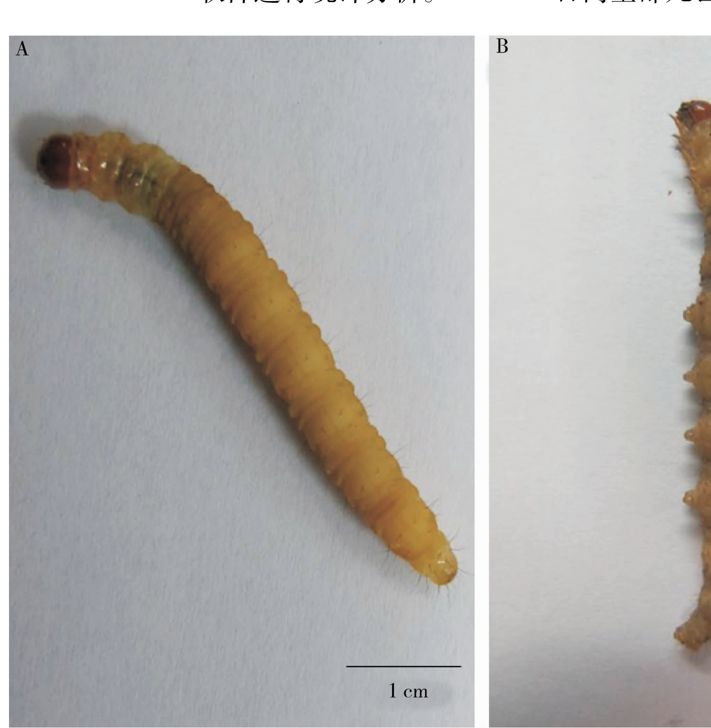


图 1 不同温度处理下的小金蝠蛾 8 龄幼虫

Fig. 1 The 8th instar larvae of *Thitarodes xiaojinensis* maintained at different temperatures

A: 16℃处理 24 h 的 8 龄幼虫 8th instar larva maintained at 16℃ for 24 h; B: 27℃处理 24 h 的 8 龄幼虫 8th instar larva maintained at 27℃ for 24 h.

2.2 热胁迫对小金蝠蛾幼虫中肠消化酶活性的影响

消化酶活性测定结果显示(图 2 和 3),在 16 ~ 37℃ 的反应温度范围内,无论热胁迫组还是正常组,幼虫中肠总蛋白酶和糖基水解酶活性均随温度升高而增强。在同一反应温度下,高温组幼虫总蛋白酶与糖基水解酶活性均低于对照组。协方差分析表明,蛋白酶的反应温度对高温组和对照组间的酶活性的影响差异极显著($df=1$, $F=26.31$, $P<0.001$);控制反应温度因素的影响后,高温组与对照组的蛋白酶活性的差异极显著($df=1$, $F=26.310$, $P<0.001$)。测定糖基水解酶的反应温度对两种温度处理组的酶活性的影响同样存在极显著差异($df=1$, $F=40.122$, $P<0.001$),控制该因素的影响后,高温组与对照组的糖基水解酶活性差异极显著($df=1$, $F=1$, $P=0.008$)。即热胁迫后对虫体的蛋白酶和糖基水解酶活性的影响均极显著。考虑到不同处理组幼虫的生存温度不同,将热胁迫

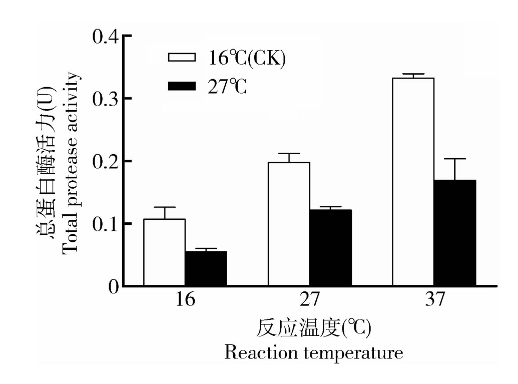


图 2　不同温度处理 24 h 后小金蝠蛾 8 龄幼虫中肠液总蛋白酶在不同反应温度下的酶活性

Fig. 2　Protease activities in the midgut fluid of the 8th instar larvae of *Thitarodes xiaojinensis* maintained at different temperatures for 24 h

图中数据为平均值 ± 标准误；下图同。Data in the figure are mean ± *SE*. The same for the following figures.

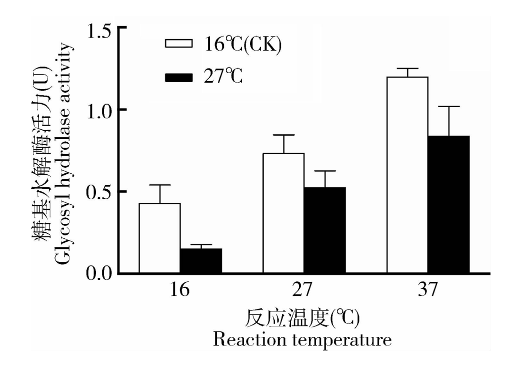


图 3　不同温度处理 24 h 后小金蝠蛾 8 龄幼虫中肠液糖基水解酶在不同反应温度下的酶活性

Fig. 3　Glycosyl hydrolase activities in the midgut fluid of the 8th instar larvae of *Thitarodes xiaojinensis* maintained at different temperatures for 24 h

处理组在 27℃的蛋白酶活性及糖基水解酶活性分别与正常组在 16℃下的进行 t 检验，结果显示，两种酶的活性差异均不显著（蛋白酶 $P = 0.381$，糖基水解酶 $P = 0.572$）。

2.3　热胁迫对小金蝠蛾幼虫血淋巴丙二醛含量的影响

对血淋巴中丙二醛含量的测定结果显示（图 4），给予 27℃胁迫后，小金蝠蛾幼虫体内的丙二醛含量显著升高至对照组的近 2 倍，t 检验二者差异极显著（$P = 0.004$），提示热胁迫处理的小金蝠蛾幼虫体内的活性氧不能被充分消解，脂质被超量的活性氧严重过氧化。

2.4　热胁迫对小金蝠蛾幼虫中肠细胞线粒体结构的影响

27℃热胁迫处理后，高温组与对照组相比，结

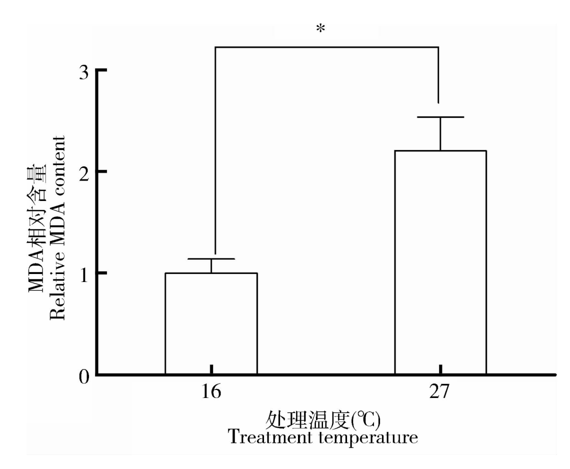


图 4　不同温度处理 24 h 后小金蝠蛾 8 龄幼虫血淋巴中丙二醛的相对含量

Fig. 4　The relative contents of methane dicarboxylic aldehyde (MDA) in the hemolymph of the 8th instar larvae of *Thitarodes xiaojinensis* maintained at different temperatures for 24 h

以对照组 OD_{535} 值为 1。柱上星号表示高温组与对照组的丙二醛相对含量经 t 检验差异显著（$P < 0.05$）。The OD_{535} value of the control group (16℃) is set as 1. The asterisk above bars indicates significant difference of the relative MDA content between the high temperature group and the control group by t-test ($P < 0.05$).

构差异明显。可以看到对照组中线粒体膜结构完整，线粒体内嵴排列有序，且形态正常；而高温组中，线粒体内嵴排列混乱，线粒体出现不同程度的肿胀、空泡，线粒体膜破损（图 5）。这表明 27℃下，小金蝠蛾幼虫存在严重的线粒体氧化损伤，造成结构性的破坏。

2.5　热胁迫对小金蝠蛾幼虫血淋巴 3 种保护酶（SOD，POD，CAT）活性的影响

27℃胁迫处理 24 h 后，小金蝠蛾血淋巴中的 SOD 与 CAT 活性均无显著变化（$P_{SOD} = 0.617$，$P_{CAT} = 0.137$），仅 POD 活性显著提高（$P = 0.031$）（图 6）。为此，可能 POD 活性的提高不足以维持热胁迫下虫体的活性氧代谢平衡，导致活性氧积累，由此造成热胁迫下，MDA 水平上升，线粒体受损等氧化损伤。

3　讨论

究竟是什么原因导致生物在经受热处理后最终死亡？Bowler 等（1973）提出，热对细胞膜的破坏是关键原因。Denlinger 和 Lee（1998）加入了生物的整体观，提出了耐热性的分级机制，即大分子\细胞\组织\整个的生物体。迄今为止，在相关文献中，尚不能将热致死原因归为一种。

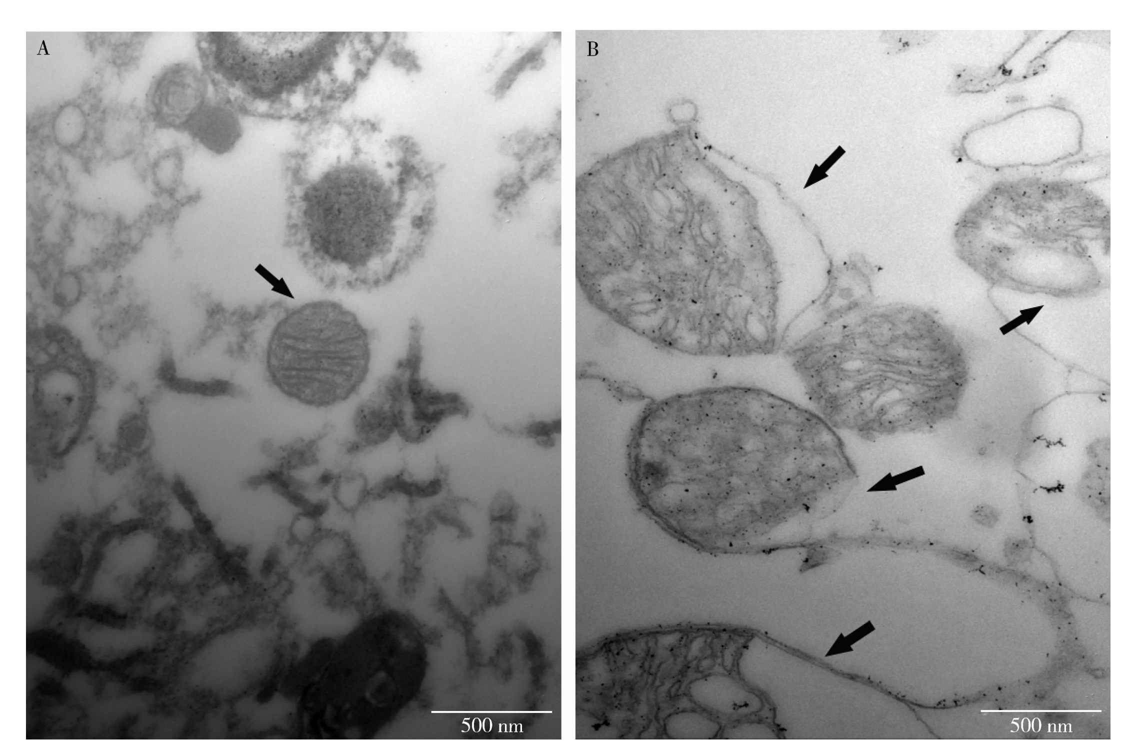


图 5 小金蝠蛾 8 龄幼虫中肠细胞线粒体透射电镜照片

Fig. 5 TEM of mitochondria in the midgut cell of the 8th instar larvae of *Thitarodes xiaojinensis*

A：16℃处理 24 h 的 8 龄幼虫的中肠细胞，图中可见线粒体（箭头所示）结构完整，线粒体嵴排列正常有序 The midgut cell of the 8th instar larva maintained at 16℃ for 24 h, showing an intact mitochondrion (indicated by arrow) with normal cristae; B：27℃处理 24 h 的 8 龄幼虫的中肠细胞，图中可见线粒体（箭头表示）肿胀，出现空泡，膜破裂，线粒体嵴排列混乱 The midgut cell of the 8th instar larva maintained at 27℃ for 24 h, showing swollen mitochondria (indicated with arrows) with broken membrane, vesicles and disarranged cristae.

小金蝠蛾主要生活在高海拔地区，经过长期进化适应了低温的生活环境，在室温下不适应、无法正常生存。高温热胁迫下，虫体的消化酶活性显著下降，然而，由于在 16～37℃ 的反应温度范围内，酶活性随反应温度升高而增高，致使 27℃ 热胁迫组在 27℃下的酶活性与 16℃ 正常组在 16℃ 下的酶活性差异不显著。为此，我们推测消化酶活性的变化可能并非小金蝠蛾室温不耐受的一个重要因素。

热胁迫组小金蝠蛾幼虫血淋巴中氧化损伤标志物丙二醛的含量显著升高，说明温度胁迫后，小金蝠蛾幼虫体内活性氧积累，发生了严重的氧化损伤。而且丙二醛容易与蛋白质和 DNA 结合，破坏生物大分子的结构与功能（Seal *et al*., 2003），对虫体可造成进一步的损害。线粒体的透射电镜结果显示，27℃下，小金蝠蛾幼虫线粒体膜受损，结构破坏，证实了热胁迫已对线粒体造成了严重损伤。线粒体是细胞能量代谢最重要的细胞器，在氧化磷酸化的过程中可产生一定量的自由基，由于抗氧化防御体系的存在，在生理状态下二者维持动态平衡，从而保护线粒体不被损伤。但在自由基产生过多时，靠近呼吸链的线粒体内膜容易受到氧化损伤，造成线粒体内膜脂质的过氧化反应、膜流动性降低、膜脂质降解等，从而影响跨越线粒体膜的质子梯度，使线粒体合成 ATP 的功能发生障碍。与此同时，线粒体的功能障碍又可导致自由基产生增多，过多的氧自由基不能被及时清除，进一步引起生物膜结构蛋白质和脂质过氧化，损害线粒体膜的通透性，引起电子传递链活性的进一步下降，进而形成恶性循环，使氧自由基生成进一步增加，氧化损伤加剧，线粒体结构和功能遭到严重破坏。线粒体损伤可引起一系列的细胞功能障碍，最终造成细胞及组织的死亡。

生物体内活性氧的清除是在保护酶系统的 3 种酶的协同作用下完成的。SOD 是最重要的清除自由 9 基的酶之一，首先将 O_2^- 自由基形成 H_2O_2，再由 CAT 和 POD 将 H_2O_2 分解。POD 清除 H_2O_2，需要还原性底物，且对 H_2O_2 亲和力高，CAT 则不需要还原力，并具有较高活性，但对 H_2O_2 亲和力弱（杜秀敏等，2001）。SOD，CAT 和 POD 三者相对水平的高低对于它们抗氧化作用的有效发挥很重要。褐飞虱取食转基因抗虫水稻后，SOD 和 CAT

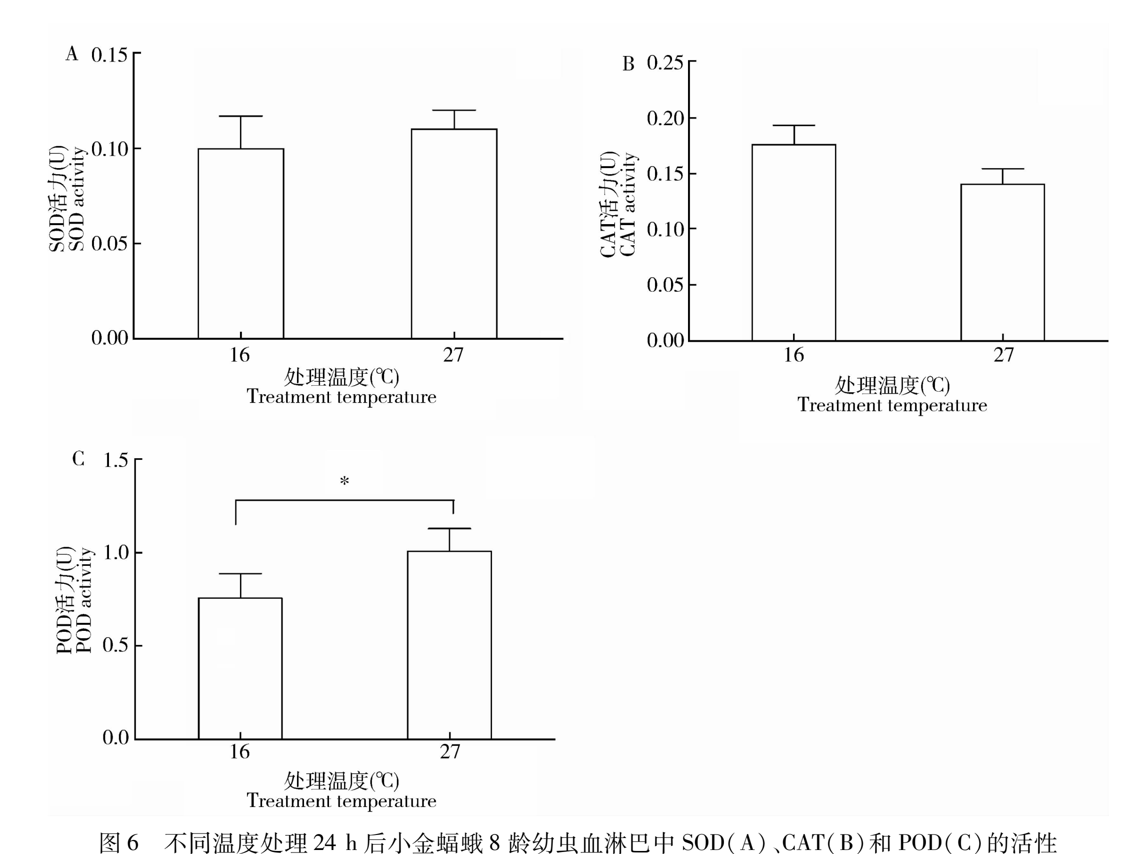


图 6　不同温度处理 24 h 后小金蝠蛾 8 龄幼虫血淋巴中 SOD(A)、CAT(B)和 POD(C)的活性

Fig. 6　The activities of superoxide dismutase (A), catalase (B) and peroxidase (C) in the hemolymph of the 8th instar larvae of *Thitarodes xiaojinensis* maintained at different temperatures for 24 h

柱上星号示高温组与对照组的保护酶活性经 *t* 检验差异显著($P<0.05$)。The asterisk above bars indicates significant difference in the activities of protective enzymes between the high temperature group and the control group by *t*-test ($P<0.05$).

活性显著升高，POD 活性没有变化(吕仲贤等，1997)。我们的研究结果显示，热胁迫下，SOD 和 CAT 活性没有显著变化，仅 POD 活性显著升高。前述丙二醛含量的升高和线粒体结构的破坏，表明热胁迫下，小金蝠蛾的抗氧化系统不能有效地清除活性氧，已造成严重的氧化损伤，这意味着热胁迫下，仅仅 POD 活性的提高不足以维持体内原有的活性氧代谢平衡，导致活性氧大量积累，对机体造成损伤，宏观上表现为虫体不适、死亡。

27℃胁迫后小金蝠蛾幼虫 SOD 与 CAT 活性变化不显著，这其中可能是小金蝠蛾幼虫的温度感应相关的某个重要基因不表达或低表达造成的，导致虫体中 SOD 及 CAT 不能对胁迫温度产生响应，从而使体内大量积累活性氧。SOD 和 CAT 在活性氧代谢平衡中起着重要作用，对小金蝠蛾幼虫在温度胁迫下能否正常生活至关重要，值得进一步深入研究。在当前全球气候变暖的背景下，小金蝠蛾幼虫温度胁迫不适性相关研究对于虫草资源的保护利用具有重要意义。

参考文献(References)

Boonstra J, Post JA, 2004. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene*, 337: 1–13.

Bowler K, Duncan CJ, Gladwell RT, Davison TF, 1973. Cellular heat injury. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 45(2): 441–450.

Cai H, Shen RF, 2005. Determination of soil protease activity with modified ninhydrin colorimetry. *Acta Pedologica Sinica*, 42(2): 306–313. [蔡红，沈仁芳，2005. 改良茚三酮比色法测定土壤蛋白酶活性的研究. 土壤学报，42(2): 306–313]

Chance B, Sies H, Boveris A, 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, 59(3): 527–605.

Cheng LJ, Meng Z, 1994. Molybdate colorimetric method for determination of catalase in serum. *Chinese Journal of Clinical Laboratory Science*, 12(1): 6–8. [程鲁京，孟泽，1994. 钼酸铵显色法测定血清过氧化氢酶. 临床检验杂志，12(1): 6–8]

Cui YD, Du YZ, Lu MX, Hu MZ, 2010. Effect of thermal stress on the generation of ROS, HSP90 and apoptosis in haemocytes of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Acta Entomologica Sinica*, 53(7): 721–726. [崔亚东，杜予州，陆明星，胡茂志，

2010. 热胁迫对二化螟幼虫血淋巴细胞内活性氧、HSP90 及细胞凋亡的影响. 昆虫学报, 53(7): 721-726]

Denlinger DL, Lee RE, 1998. Physiology of cold sensitivity. In: Hallman GJ, Denlinger DL eds. Temperature Sensitivity in Insects and Application in Integrated Pest Management, Westview Press, Boulder, Colorado. 55-97.

Du XM, Yin WX, Zhao YX, Zhang H, 2001. The production and scavenging of reactive oxygen species in plants. *Chinese Journal of Biotechnology*, 17(2): 121-125. [杜秀敏, 殷文璇, 赵彦修, 张慧, 2001. 植物中活性氧的产生及清除机制. 生物工程学报, 17(2): 121-125]

Esterbauer H, Cheeseman KH, 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, 186: 407-421.

Felton GW, Summers CB, 1995. Antioxidant systems in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 29(2): 187-197.

Fridovich I, 1977. Oxygen is toxic. *Bioscience*, 27(7): 462-466.

Gill SS, Tuteja N, 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12): 909-930.

Janero DR, 1990. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 9(6): 515-540.

Kasahara Y, Iwai K, Yachie A, Kunio O, Konno A, Seki H, Miyawaki T, Taniguchi N, 1997. Involvement of reactive oxygen intermediates in spontaneous and CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis of neutrophils. *Blood*, 89(5): 1748-1753.

Li JS, Li JL, Wu TT, 2004. Distribution and properties of amylase and lipase in alimentary tract of tilapia *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 11(5): 473-477. [黎军胜, 李建林, 吴婷婷, 2004. 奥尼罗非鱼淀粉酶、脂肪酶的分布与特性. 中国水产科学, 11(5): 473-477]

Li ZZ, Shen HJ, Jiang QG, Ji BZ, 1994. A study on the activities of endogenous enzymes of protective system in some insects. *Acta Entomologica Sinica*, 37(4): 399-403. [李周直, 沈惠娟, 蒋巧根, 嵇保中, 1994. 几种昆虫体内保护酶系统活力的研究. 昆虫学报, 37(4): 399-403]

Lv ZX, Yu XP, Zheng XS, Chen JM, Zhang ZT, 1997. Variation in virulence of the brown planthopper to resistant rice varieties and its relation to the changes in the activities of endogenous enzymes. *Acta Entomologica Sinica*, 40(Suppl.): 122-126. [吕仲贤, 俞晓平, 郑许松, 陈建明, 张志涛, 1997. 褐飞虱致害性变异过程及其体内酶的变化. 昆虫学报, 40(增刊): 122-126]

McCord JM, Fridovich I, 1969. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244(22): 6049-6055.

Miegel RP, Pain SJ, Van Wettere W, Howarth GS, Stone DAJ, 2010. Effect of water temperature on gut transit time, digestive enzyme activity and nutrient digestibility in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). *Aquaculture*, 308(3): 145-151.

Misra HP, Fridovich I, 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 247(10): 3170-3175.

Pavasovic M, Richardson NA, Anderson AJ, Mann D, Master PB, 2004. Effect of pH, temperature and diet on digestive enzyme profiles in the mud crab, *Scylla serrata*. *Aquaculture*, 242(1): 641-654.

Seal JR, Havrilla CM, Porter NA, 2003. Analysis of unsaturated compounds by Ag^+ coordination ionspray mass spectrometry: studies of the formation of the Ag^+/lipid complex. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 14(8): 872-880.

St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD, 2002. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Biological Chemistry*, 277(47): 44784-44790.

Tu J, Wang GJ, 2005. Studies on the optimum reaction conditions of proteinases in 5th instar larvae of silkworm, *Bombyx mori*. *Science of Sericulture*, 31(1): 100-102. [屠洁, 王国基, 2005. 家蚕 5 龄幼虫蛋白水解酶的最适反应温度和 pH 值. 蚕业科学, 31(1): 100-102]

Tu YQ, Zhang DL, Zeng W, Chen SJ, 2011. Study on biological characteristic of *Hepialus xiaojinensis* in Sichuan. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(4): 990-996. [涂永勤, 张德利, 曾纬, 陈仕江, 2011. 四川小金蝠蛾生物学特性研究. 应用昆虫学报, 48(4): 990-996]

Tu YQ, Zhu HL, Zhang DL, Chen T, Chen SJ, 2013. Distribution of host of *Ophiocordyceps sinensis*-*Hepialus xiaojinensis*. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 26(5): 2167-2169. [涂永勤, 朱华李, 张德利, 陈恬, 陈仕江, 2013. 冬虫夏草寄主——小金蝠蛾分布规律研究. 西南农业学报, 26(5): 2167-2169]

(责任编辑: 赵利辉)